USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR SUBCELLULAR LOCALIZATION STUDY OF *Papaya ringspot potyvirus* P3 PROTEIN

SARASATE EIAMTANASATE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การใช้โปรตีนเรืองแสงสีเขียวในการศึกษาตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีน P3 ของไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวน (USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR SUBCELLULAR LOCALIZATION STUDY OF *Papaya ringspot potyvirus* P3 PROTEIN)

สารเศรษฐ์ เอี่ยมธนเศรษฐ์ 4437582 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : YUN-KIAM YAP, Ph.D., สุณี เกิดบัณฑิต, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่รุนแรงในมะละกอ ซึ่งมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ก่อนที่จะผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นโปรตีนที่สามารถทำงานได้จำนวน 10 ชนิด P3 เป็นโปรตีนลำดับที่ 3 ของไวรัสที่ถูกสันนิษฐานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส การก่อโรค และความจำเพาะของพืชเจ้าบ้าน อย่างไรก็ดีหน้าที่และตำแหน่งของ P3 ภายในเซลล์ที่ติดโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการหาตำแหน่งของ P3 ภายในเซลล์โดยการสร้างโปรตีนลูกผสมที่ประกอบด้วยส่วนของ P3 และโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein, GFP) เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เยื่อหอม

ทำการสร้างเวคเตอร์หลายชนิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ P3 ส่วนต่างๆ และ/หรือ $6K_1$ และยีนที่สร้าง GFP เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสมหลายรูปแบบภายในเซลล์เยื่อหอม จากนั้นนำเวคเตอร์ข้างต้นเข้าสู่เซลล์เยื่อหอมโดยการยิงอนุภาคโดยลำพังหรือร่วมกับเวคเตอร์ที่สร้างโปรตีนเรืองแสงสีแดง (ER-DsRed2) ที่มีตำแหน่งจำเพาะอยู่ที่ endoplasmic reticulum (ER) ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนลูกผสมที่มีส่วนของ P3 หรือ P3-$6K_1$ หรือ P3 ที่ขาดส่วนปลายอะมิโนสามารถพบได้ที่ ER ในขณะที่โปรตีนลูกผสมที่มีส่วนของ $6K_1$ เท่านั้น หรือ P3 ที่ขาดส่วนปลายคาร์บ๊อกซี่สามารถพบกระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ ผลนี้บ่งชี้ว่า P3 สามารถพบได้ที่ ER โดยมีส่วนปลายคาร์บ๊อกซี่ของ P3 เป็นส่วนสำคัญต่อการระบุการไปสู่ตำแหน่งเป้าหมายที่ ER นอกจากนี้ยังพบว่า $6K_1$ ไม่มีผลต่อ P3 ในการไปสู่ตำแหน่งที่ ER และ ไม่พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่เป็น ER-targeted ใน P3 จากผลดังกล่าวสันนิษฐานว่าการที่พบ P3 ได้ที่ ER นั้นอาจเป็นผลมาจากการที่โปรตีนมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นส่วนสำคัญในการระบุตำแหน่งเป้าหมาย ดังนั้นการศึกษานี้ได้ทำการทำนายหาส่วนที่ไม่ชอบน้ำและพบว่า P3 มีส่วนดังกล่าวอยู่ในทั้งส่วนปลายอะมิโนและปลายคาร์บ๊อกซี่ การทดลองต่อมาได้ใช้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่ปลายคาร์บ๊อกซี่ (Hy2) มาสร้างโปรตีนลูกผสมกับ GFP และพบว่ามีตำแหน่งอยู่ที่ ER เช่นเดียวกับโปรตีนลูกผสม GFP ที่มีส่วนของ P3 หรือ P3-$6K_1$ หรือ P3 ที่ขาดส่วนปลายอะมิโน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Hy2 เป็นส่วนสำคัญต่อการระบุการไปสู่ตำแหน่งเป้าหมายที่ ER ของ P3

143 หน้า

USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR SUBCELLULAR LOCALIZATION STUDY OF *Papaya ringspot potyvirus* P3 PROTEIN

SARASATE EIAMTANASATE 4437582 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: YUN-KIAM YAP, Ph.D., SUNEE KERTBUNDIT. Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D.

ABSTRACT

Papaya ringspot potyvirus (PRSV) causes a severe disease in papayas. Its genome is a single messenger-polarity RNA which is translated into a polyprotein that is processed into 10 functional proteins. The P3 protein, encoded by the 3rd cistron has been proposed to be involved in viral replication, pathogenicity determination and host specificity. However, its exact function/s and subcellular localization in infected cells still remain unclear. Therefore, the objective of this study was to determine the subcellular localization of PRSV P3 by expressing its green fluorescent (GFP) fusion protein in onion epidermal cells, in order to further understand its function/s.

Plant expression vectors containing P3 or its derivatives fused with gfp gene were constructed and expressed transiently in onion epidermal cells. Single or co-bombardment of each of the above constructs with an endoplasmic reticulum (ER) targeted DsRed2 construct (ER-DsRed2) indicated that GFP fusion proteins of P3-, P3-$6K_1$- and N-terminal truncated P3 (CP3-$6K_1$-GFP) were localized at ER, whereas those of $6K_1$- and C- terminal truncated P3 (NP3-GFP) were expressed all over the transfected cells as for the free GFP. These results suggested that P3 is localized at ER, and the localization determinant sequence is located at its C-terminus. The result also indicated that the presence of $6K_1$ protein, encoded by the 4th cistron, does not affect the localization of P3 protein as suggested in other reports. The lack of ER-targeted sequence suggested that the presence of hydrophobic region/s within the P3 protein might contribute to its ER localization. Therefore, hydrophobic region prediction was performed and 2 hydrophobic regions located at the N- and C-terminal region of P3 protein respectively were found. A construct which express the second hydrophobic region (Hy2) fused with GFP in plant cell was created and expressed in onion epidermal cells. The results indicated that Hy2 GFP fusion protein co-localized with the ER-DsRed2 fusion protein. These data confirm that the Hy2 which is located at the C-terminal region is the localization determinant sequence for PRSV P3 protein.

KEY WORDS: *Papaya ringspot potyvirus* / LOCALIZATION / HYDROPHOBIC / ENDOPLASMIC RETICULUM / P3 / POTYVIRUS
143 pp.